



Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»

II Всероссийская Школа-конференция «Клеточные и геномные технологии для совершенствования сельскохозяйственных животных» ВНИИГРЖ 26-27.06.2023 г.

Влияние концентраций кверцетина на качественные показатели заморожено-оттаянных сперматозоидов петухов.

Исследование выполнено в рамках ГЗ № 121052600357-8

Докладчик - Плешанов Н. В.
научный сотрудник лаборатории генетики,
разведения и сохранения генетических
ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ.

Санкт-Петербург – Пушкин
2023

Криоконсервация семени является важным приемом сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц.

Репродуктивные клетки, закладываемые в криобанк, должны соответствовать ГОСТу № 27267—2017 и обеспечивать высокую фертильность после оттаивания.

В процессе криоконсервации и оттаивания на сперматозоиды могут влиять различные факторы, оказывая обратимые и необратимые изменения в клетках.

Одним из таких факторов является оксидативный стресс – процесс связанный с увеличением скорости окисления клеточных компонентов и избыточной выработкой активных форм кислорода (АФК). Это может приводить к разрушению нуклеиновых кислот, повреждению компонентов клеточной стенки и органелл сперматозоидов, особенно липидных, белковых молекул и нарушению работы митохондрий.

Сперматозоиды птиц характеризуются низкой концентрацией цитоплазматических антиоксидантов и повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот в их фосфолипидах. В результате данной особенности мужские гаметы птиц более восприимчивы к перекисному окислению липидов.

Таким образом, использование вспомогательных антиоксидантных соединений имеет важное значение для эффективного сохранения репродуктивных клеток в процессе замораживания-оттаивания.

В данном исследовании в качестве дополнительного антиоксиданта использовался кверцетин. Кверцетин ($C_{15}H_{10}O_7$) – флавоноид, обладающий меньшей цитотоксичностью и более высокой антиоксидантной активностью (по сравнению с витаминами С и Е). Наличие полифенольной субструктуры в кверцетине позволяет ингибировать окисление и действовать как поглотитель свободных радикалов.

Цели и задачи исследования

Изучение влияния различных концентраций кверцетина на качественные показатели семени петухов после протокола замораживания-оттаивания.

Выявление оптимальной концентрации вещества с наиболее высокими показателями фертильности семени после криоконсервации.

Материалы и методы

Опыт проводился на базе ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ. Объектом исследования являлись петухи породы род-айланд красный в возрасте 45 недель жизни.

Сперму получали в пенициллиновые флаконы, объемом 10 мл, при помощи метода абдоминального массажа (Burrows and Quinn 1935).

В эксперименте использовали смешанную сперму. Объем каждого индивидуального эякулята измерялся градуированными пипетками, оценивался по показателям подвижности и концентрации сперматозоидов, после чего объединялся с другими образцами и делился на 4 равные аликвоты, для внесения соответствующего разбавителя.

В качестве среды для разбавления (в соотношении 1:1) и последующей криоконсервации использовали:

- Контроль (Разбавитель ЛКС-1);
- Группа № 1 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,005 мг/мл);
- Группа № 2 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,010 мг/мл);
- Группа № 3 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,020 мг/мл);

Оценку подвижности сперматозоидов проводили с помощью системы визуальной микроскопии Motic VA310E, («Motic Instruments Inc.», Канада).

Концентрацию смешанных эякулятов измеряли с помощью лабораторного фотометра Accuread Photometer («IMV Technologies», Великобритания).

Криоконсервация производилась в гранулах, путем прямого накапывания семени в жидкий азот. В качестве криопротектора использовали - N,N-Диметилацетамид (DMA) в количестве, соответствующем конечной концентрации - 6%.

Оттаивание гранул проводилось при t 60°C в щелевом оттаивателе (оборудование разработки ВНИИГРЖ, 1989 год).

Поврежденность плазматических мембран сперматозоидов в нативном и деконсервированном семени оценивали при помощи метода суправитальной окраски по Блюму. Препараты просматривали при увеличении $\times 1000$ с масляной иммерсией. Сперматозоиды с поврежденными мембранами окрашивались в красный цвет, интактные клетки оставались белыми (бесцветными). В каждом препарате оценивалось не менее 200 клеток.

Определение жизнеспособности, процента апоптических клеток и уровней генерации АФК в сперматозоидах петухов проводили при помощи проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter, Inc.) с программным обеспечением CytExpert, Version 2.4.0.28 (Beckman Coulter, Inc.).

- Определение жизнеспособности, процента апоптических клеток и др. показателей – набор на основе Аннексина V (PI).

Конечная концентрация клеток 3-6 $\times 10^6$ / мл, конечная концентрация флуохрома 1 мкМ.

- Определение уровней генерации АФК (внутриклеточный Пероксид водорода H_2O_2) – флуохром 2',7'-Дихлородигидрофлуоресцеин диацетат.

Конечная концентрация клеток 3-6 $\times 10^6$ / мл, конечная концентрация флуохрома 4 мкМ.

Таблица 1. Качественные показатели смешанных эякулятов с различными группами сред по концентрации кверцетина.

Группы	Средняя концентрация спермы, млрд/мл	Нативная сперма		Заморожено-оттаянное семя	
		Средняя подвижность, %	Среднее количество клеток с поврежденной мембраной, %	Средняя подвижность, %	Среднее количество клеток с поврежденной мембраной, %
Контроль (Разбавитель ЛКС-1)	4,35 ± 0,16	81,25 ± 1,85	16,25 ± 1,01	37,50 ± 1,44	65,95 ± 1,68
№ 1 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,005 мг/мл)	4,35 ± 0,16	81,25 ± 1,85	13,20 ± 1,47	36,25 ± 1,25	59,18 ± 1,74
№ 2 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,010 мг/мл)	4,35 ± 0,16	81,25 ± 1,85	14,87 ± 0,61	37,50 ± 4,33	62,30 ± 2,51
№ 3 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,020 мг/мл)	4,35 ± 0,16	81,25 ± 1,85	13,72 ± 0,70	35,00 ± 2,89	60,30 ± 1,71

Таблица 2. Качественные показатели смешанных эякулятов с различными группами сред по концентрации кверцетина (оценка при помощи проточной цитометрии)

Группы	Нативная сперма				Заморожено-оттаянное семя			
	Живые клетки, %	Апоптоз клеток, %	Некроз клеток, %	Внутриклеточный H ₂ O ₂	Живые клетки, %	Апоптоз клеток, %	Некроз клеток, %	Внутриклеточный H ₂ O ₂
Контроль (Разбавитель ЛКС-1)	73,98 ± 1,55	3,18 ± 0,88	6,64 ± 1,14	35,37 ± 2,49	52,94 ± 4,43	2,34 ± 0,52	19,94 ± 1,87	41,37 ± 11,00
№ 1 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,005 мг/мл)	-	-	-	-	67,64 ± 6,31	0,96 ± 0,34	8,50 ± 1,56	20,48 ± 8,93
№ 2 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,010 мг/мл)	-	-	-	-	70,62 ± 5,72	1,56 ± 0,39	11,29 ± 1,25	7,93 ± 5,67
№ 3 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,020 мг/мл)	-	-	-	-	72,66 ± 2,33	1,46 ± 0,61	11,86 ± 1,85	37,04 ± 19,80

Выводы

1. По результатам исследований наиболее высокие показатели целостности мембран спермиев, были получены в группах №1 (ЛКС-1 + 0,005 мг/мл кверцетина) и № 3 (ЛКС-1 + 0,020 мг/мл кверцетина) как в нативном , так и в деконсервированном семени, соответственно.
2. Меньшие проценты клеток с апоптозом, некрозом и внутриклеточным H_2O_2 , а также наибольший процент жизнеспособных клеток был получен в экспериментальных группах, в сравнении с контрольной группой. Это указывает на положительное влияние кверцетина на репродуктивные клетки в процессе криоконсервации.
3. Использование кверцетина, как антиоксиданта дополняющего среду-разбавитель, позволяет улучшать показатели спермы петухов после протокола замораживания-оттаивания.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Благодарю за помощь в работе и подготовке доклада:

Курочкина А.А. м.н.с., отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ

Сотрудников отдела биоресурсных коллекций генофондных пород сельскохозяйственных животных **ВНИИГРЖ**

Работа выполнена на поголовье птиц БРК «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ